

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑪ DE 3903648 A 1

⑤1 Int. Cl. 5:  
**A61 L 2/02**  
C 02 F 1/36  
// A23C 7/00

②1 Aktenzeichen: P 39 03 648.0  
②2 Anmeldetag: 8. 2. 89  
④3 Offenlegungstag: 16. 8. 90

DE 3903648 A 1

⑦1 Anmelder:  
Bran + Luebbe GmbH, 2000 Norderstedt, DE; Bayer  
AG, 5090 Leverkusen, DE

⑦4 Vertreter:  
Meyer, L., Dipl.-Ing.; Vonnemann, G., Dipl.-Ing.  
Dr.-Ing., Pat.-Anwälte, 2000 Hamburg

⑦2 Erfinder:  
Klopp, Rainer, Dipl.-Ing., 2000 Norderstedt, DE;  
Crueger, Wulf, Dr., 4006 Erkrath, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren und Anlage zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren, wobei innerhalb der Flüssigkeit Kavitation erzeugt wird. Die Kavitation wird vorzugsweise durch Veränderung der Fließgeschwindigkeit in der Flüssigkeit erzeugt.

Außerdem betrifft die Erfindung eine Anlage zur Durchführung des Verfahrens, wobei diese mindestens eine Hochdruckpumpe mit nachgeschaltetem Homogenisierventil aufweist. Die Hochdruckpumpe ist vorzugsweise als Membranpumpe ausgebildet.

DE 3903648 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Anlage zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren.

Viren können bekanntlich durch chemische Substanzen (chemische Sterilisation) oder durch Erhitzen der Flüssigkeit (Hitzeesterilisation) unschädlich gemacht werden. Des weiteren ist bekannt, Viren mittels Ultrafiltration aus Flüssigkeiten zu entfernen.

Ein Nachteil der chemischen Sterilisation liegt darin, daß die zur Inaktivierung erforderlichen Substanzen in der Flüssigkeit selbst verbleiben und zu nachteiligen Nebenwirkungen führen können. Der Nachteil der Hitzeesterilisation liegt darin, daß eine thermische Zersetzung oder zumindest Modifikation der in der Flüssigkeit vorhandenen Komponenten eintreten kann. Dies ist besonders gravierend, wenn es sich bei der Flüssigkeit um Kulturüberstände handelt, die hochempfindliche Substanzen, wie z. B. Proteine enthalten.

Bei der Entfernung von Viren mittels Ultrafiltration wirkt sich nachteilig aus, daß dieses Verfahren nicht zur Behandlung von Suspensionen geeignet ist, da in diesem Fall eine Abtrennung der festen Phase erfolgen würde.

Zusätzlich besteht die Gefahr der Adsorption von Bestandteilen aus der Lösung der Filtermaterialien. Weiterhin kann der Prozeß im technischen Maßstab nur sehr schwer und kostenaufwendig unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Auch müssen die Filter in regelmäßigen Abständen gereinigt und gewechselt werden, das je nach Art der herausgefilterten Viren zu Entsorgungsschwierigkeiten führen kann.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Anlage zur Durchführung des Verfahrens zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen, ohne die nachteiligen Wirkungen der bekannten Verfahren Viren in Flüssigkeiten zu inaktivieren. Diese Aufgabe wird entsprechend den kennzeichnenden Teilen der Ansprüche 1 und 10 gelöst.

Vorteilhafte Ausgestaltungen des Verfahrens sind in den Unteransprüchen 2 bis 9 beschrieben. Die Unteransprüche 11 bis 18 betreffen vorteilhafte Ausgestaltungen der Anlage zur Durchführung des Verfahrens.

Überraschenderweise werden selbst so kleine organische Bestandteile, wie sie Viren darstellen, durch Kavitationswirkung inaktiviert. Dabei bleiben andere Begleitsubstanzen innerhalb der Flüssigkeit vorteilhaft unverändert. Als besonders günstig hat sich bei Versuchen ergeben, wenn dabei ein Energieeintrag in die Flüssigkeit zwischen 10 000 Ws bis 150 000 Ws je Liter eingestellt wird.

Besonders nützlich ist diese Methode zur Qualitätssicherung bei der Reinigung von Kulturüberständen von Zellkulturen und bei der Aufreinigung von Produkten, die durch Fermentation von Organismen mit rekombinierter DNA hergestellt werden. Als Beispiel, aber nicht ausschließlich, ist die Produktion von Plasma Faktor VIII und anderen Blutfaktoren anzusehen.

Aber auch bei der Produktion von mikrobiellen Kulturen, die sehr Bacteriophagen-empfindlich sind, ist diese Methode der Virus-Inaktivierung sehr günstig.

Zur Erzeugung von Kavitation kann beispielsweise ein in die Flüssigkeit eingetauchter Schwinger dienen. Vorteilhaft wird die Flüssigkeit zusätzlich an der schwingenden Oberfläche vorbeigeführt. Dies kann auch dadurch erfolgen, daß eine schwingende Struktur innerhalb eines Rohres angeordnet wird, an der oder um die herum die Flüssigkeit durch das Rohr fließt.

Alternativ kann auch das Rohr selbst so ausgebildet sein, daß seine Wandungen in einem Abschnitt zu radialen Schwingungen angeregt werden. An der Rohrwandung entstehen dann Bereiche, in denen die Flüssigkeit kavitiert.

Besonders kostengünstig und wirksam läßt sich die Kavitation durch eine Beschleunigung der Flüssigkeit beim Überströmen von Kanten erzeugen. Die dazu erforderliche Energie läßt sich vorteilhaft durch Hochdruckpumpen bereitstellen, wobei die angebotene Energie mit hoher Ausbeute durch Homogenisierventile zur Inaktivierung von Viren genutzt werden kann.

Der Inaktivierungseffekt läßt sich vorteilhaft noch weiter dadurch erhöhen, daß in die Flüssigkeit Schall eingeleitet wird.

Dies erfolgt besonders wirksam, wenn gleichzeitig eine Fläche eines Verdichtungsraumes als Schallquelle wirkt.

Optimieren läßt sich der inaktivierende Effekt des Verfahrens dann, wenn sich die Frequenz des eingeleiteten Schalls verändern läßt.

Besonders leistungsfähig gestaltet sich das Verfahren, wenn die Flüssigkeit mehrfach Kanten überströmt und dazwischen in sich verjüngenden Räumen verdichtet wird.

Je nach dem erforderlichen Inaktivierungsgrad der Viren, kann es vorteilhaft sein, wenn der beim Überströmen der Kanten entstehende Druckverlust durch dazwischen angeordnete Hochdruckpumpen wieder ausgeglichen wird.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine Anlage geeignet, die die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 10 aufweist. Eine derartige Anlage läßt sich kostengünstig aus bereits auf dem Markt befindlichen Komponenten aufbauen.

Bei der Produktion von Metaboliten oder Proteinen mit Mikroorganismen oder Zellkulturen mit rekombinierter DNA oder bei Arbeiten mit pathogenen Viren kann die Anlage besonders sicher und steril dann betrieben werden, wenn als Hochdruckpumpe eine lecksichere Membranpumpe verwendet wird.

Ein besonders großer inaktivierender Effekt läßt sich erzielen, wenn das Homogenisierventil mehrere hintereinandergeschaltete Überströmkanten aufweist.

Noch weiter kann die Wirkung gesteigert werden, wenn zwischen den Überströmkanten verjüngende Verdichtungsräume angeordnet sind.

Die Ausbildung des Homogenisierventils mit sich zyklisch verändernder Spaltweite führt zu weiterer vorteilhafter Leistungssteigerung der gesamten Anlage.

Für praktische Anwendungsfälle hat es sich als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn in die Flüssigkeit Schall mit einer Frequenz zwischen 20 kHz und 1 MHz eingeleitet wird.

Sehr effektiv läßt sich der Schall dann in die Flüssigkeit einleiten, wenn die Flächen des Homogenisierventils, die die sich verjüngenden Verdichtungsräume begrenzen, aus magnetostruktivem Material gefertigt sind, das einem sich wechselnden Magnetfeld ausgesetzt ist.

Alternativ dazu hat sich in anderer Ausgestaltung als kostengünstige Lösung die Einleitung des Schalls in die Flüssigkeit durch piezoelektrische Materialien erwiesen, mit denen die die Verdichtungsräume begrenzenden Flächen entweder belegt sind oder aber wenn eine aus piezoelektrischem Material bestehende Schallquelle innerhalb der Verdichtungsräume angeordnet wird.

Die Erfindung wird in Zeichnungen beschrieben, wobei weitere vorteilhafte Einzelheiten den Zeichnungen

zu entnehmen sind.

Die Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 schematisch die erfindungsgemäße Anlage,

Fig. 2 schematisch die Spaltausbildung eines geeigneten Homogenisierventils und

Fig. 3—4 die bei den Ausführungsbeispielen gemessene Abhängigkeit der überlebenden Phagen von der Beschallungszeit.

In Fig. 1 bedeutet 1 eine Flüssigkeit, die mit Viren beladen ist.

Flüssigkeiten können kohlenhydrat- oder proteinhaltige Lösungen während eines Aufarbeitungsprozesses zu Pharmazeutika oder aber auch Wasser für die Produktion sein, das virusfrei aufbereitet werden oder von Viren befreit werden muß. Dies spielt u. a. auch in der Milchindustrie eine erhebliche Rolle, da die Starterkulturen durch Bacteriophagen vernichtet werden können. Die Glutaminsäure-Fermentation mit *Corynebacterium glutamicum* ist ebenfalls extrem phagenempfindlich.

Die Flüssigkeit befindet sich in einem Bassin 2. Dabei kann es sich beispielsweise auch um ein Schwimmbad handeln, dessen Wasserqualität verbessert werden soll. Die Hochdruckpumpe 3 saugt durch die Ansaugleitung 4 die Flüssigkeit an und führt sie über die Druckleitung 5 mit einem Druck von ca. 1000 bar dem Homogenisierventil 6 zu. In diesem Ventil kavitiert die Flüssigkeit 1, so daß die Viren erfindungsgemäß inaktiviert werden. Über die Austrittsleitung 7 wird die in der Qualität verbesserte Flüssigkeit dem Bassin 2 wieder zugeführt. Auf diese Weise wird die im Kreis geführte Flüssigkeit in ihrer Qualität angehoben.

Aus der Fig. 1 ist zusätzlich ersichtlich, daß die Anlage als geschlossenes System mit steriltechnischen einwandfreien Bauteilen erstellt werden kann.

In Fig. 2 bedeuten die mit 8 und 9 bezeichneten Ventile ringförmige Kolbenende, die im Schnitt keilförmig ausgebildet sind und mit ihren Keilspitzen und der gegenüberliegenden Leitfläche 10 Ringspalten 11 und 12 bilden. Zwischen den Ringspalten entsteht durch die keilförmige Ausbildung der ringförmigen Kolbenenden 8 und 9, die konzentrisch angeordnet sind, ein sich verjüngender Verdichtungsraum 13. Zur Einleitung von Schall in die Flüssigkeit 1, die in Pfeilrichtung 14 fließt, kann der Ringkolben 8 auch magnetostruktivem Material gefertigt sein, das einem sich zyklisch verändernden Magnetfeld ausgesetzt ist.

In anderer Ausgestaltung kann eine oder mehrere den Ringraum 13 begrenzende Fläche 15, 16 und/oder 17 selbst zur Schalleinleitung genutzt werden.

Dazu kann, wie in Fig. 2 dargestellt, beispielsweise die Fläche 15 auch mit piezoelektrischem Material 18 belegt sein.

Es ist auch möglich, durch nicht dargestellte Teile einen Schwingkörper 19 innerhalb des Verdichtungsraumes anzuordnen.

Mit Hilfe eines derartig erfindungsgemäß ausgebildeten Ventils lassen sich wirkungsvoll in Flüssigkeiten befindliche Viren inaktivieren.

Der inaktivierende Einfluß der Kavitation und des eingeleiteten Schalls wird dadurch erklärt, daß beispielsweise Phagen ihrer viralen Aktivität durch Abtrennung ihrer Testikel und/oder durch Abspaltung ihres DNA-Kopfes beraubt werden.

Die Wirksamkeit des Verfahrens wurde anhand von zwei verschiedenen Typen von Viren nachgewiesen, wobei in Proben mit einem Inhalt von 50 Millilitern und einer Konzentration von ca. 100 000 Viren je Milliliter nach vier bis fünfminütiger Behandlung die Viren sich

auf Coli-Stämmen nicht mehr anzüchten ließen.

#### Beispiel 1

Von einer Abimpfung des Stammes *Escheria coli* 54 werden Zellen mit einer Impfmischung in 1 l Erlenmeyer-Kolben mit 120 ml Nährlösung (10 g/l Bacto-Trypto-Difco, 5 g/l Bacto Yeast Extract, 10 g/l NaCl p.a., aqua dest., 20 min 121°C sterilisiert) überführt und 16 h bei 37°C, 290 Upm auf der Schüttelmaschine bebrütet. Die Extinktion als Maß des Wachstums der E.coli Kulturlösung beträgt nach dieser Zeit 49,3 OD (578 nm).

Von dieser Kultur werden 33,5 ml in einen Nährlösungssoft-agar (Nährlösung wie oben plus 7,5 g/l Agar) bei 45°C gegeben und in Platten (10 ml) gegossen.

Nach Erkalten dieser Testplatten spachtelt man je 0,1 ml einer Bacteriophagenverdünnungsreihe auf und bebrütet 16 h bei 37°C. Der Bacteriophagentiter wird anhand der Phagenlyse-Höfe ausgezählt.

E.coli-Phagen MAL 315 werden als Phagenlysate in einer Ausgangskonzentration von  $2 \times 10^5$  Phagen/ml für den Versuch eingesetzt. 50 ml des Phagenlysats werden in einem vorgekühlten Becherglas mit einem Ultraschallgerät KLN der Firma Ultraschall GmbH, Heppenheim, System 582, Gerätetyp 250/101 und einem KLN-Kopf mit einer Frequenz von 15 KHz und einer Leistung von 10 Watt beschallt. Bei diesem Vorgehen wird Kavitation beobachtet. Die erste Probe wurde zu Versuchsbeginn, die weiteren im Abstand von einer Minute gezogen. Der Versuch läuft 5 min. Nach dieser Zeit wird mit den Proben eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  mit Nährlösung hergestellt. Zum Austesten des Phagentiters plattiert man aus. In Fig. 3 ist die Abnahme der vermehrungsfähigen Phagen in Abhängigkeit von der Beschallungszeit wiedergegeben. Nach 5 min ist der Phagentiter von  $10^5$  Phagen/ml auf 0 bis 10 Phagen/ml gesunken. Durch die beschriebene Behandlung wurde also die Viruskonzentration um mehr als das 10 000fache gesenkt.

#### Beispiel 2

Mit den gleichen Methoden, wie in Beispiel 1 beschrieben, werden Platten hergestellt und E.coli-Phagen MAL 103 mit einer Frequenz von 15 KHz und einer Leistung von 15 Watt beschallt. Bereits nach 4 min (Fig. 4) werden ausgehend von  $10^5$  Phagen/ml nur noch 0 bis 10 vermehrungsfähige Phagen/ml nachgewiesen.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Inaktivierung von in Flüssigkeiten befindlichen Viren, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb der Flüssigkeit Kavitation erzeugt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kavitation durch Veränderung der Fließgeschwindigkeit in der Flüssigkeit erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kavitation durch zyklisches Bewegen einer die Flüssigkeit begrenzenden Fläche erzeugt wird, wobei vorzugsweise die Flüssigkeit an der Fläche zusätzlich vorbeibewegt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeit unter hohem Druck, vorzugsweise zwischen 500 bar und 1500 bar, einem Homogenisierventil zugeführt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Homogenisierventil zur Erzeugung der Kavitation verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzeugung des hohen Druckes eine Hochdruckmembranpumpe verwendet wird. 5
7. Verfahren nach Anspruch 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Homogenisierventil in die Flüssigkeit zusätzlich Schall, vorzugsweise mit einer Frequenz zwischen 20 Kilohertz und 1 Megahertz, eingeleitet wird. 10
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung der Viren mit einer Beschallungszeit von 1 bis 20 min, bevorzugt 5 min, erfolgt. 15
9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung der Viren unter sterilen Bedingungen erfolgt. 20
10. Anlage zur Durchführung des Verfahrens nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Hochdruckpumpe mit nachgeschaltetem Homogenisierventil aufweist. 25
11. Anlage nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hochdruckpumpe als Membranpumpe ausgebildet ist.
12. Anlage nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Homogenisierventil mehrere hintereinandergeschaltete spaltenbildende Überströmkanten aufweist. 30
13. Anlage nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Überströmkanten sich verjüngende Verdichtungsräume angeordnet sind. 35
14. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Überströmkanten sich zyklisch verlagernd ausgebildet ist. 40
15. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine einen Verdichtungsraum begrenzende Fläche sich zyklisch verändernd ausgebildet ist.
16. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb eines Verdichtungsraumes eine Schallquelle angeordnet ist. 45
17. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Frequenz der zyklischen Veränderungen einstellbar ist. 50
18. Anlage nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie mehrere Hochdruckpumpen mit zugehörigem Homogenisierventil hintereinandergeschaltet aufweist. 55

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

60

65

— Leerseite —

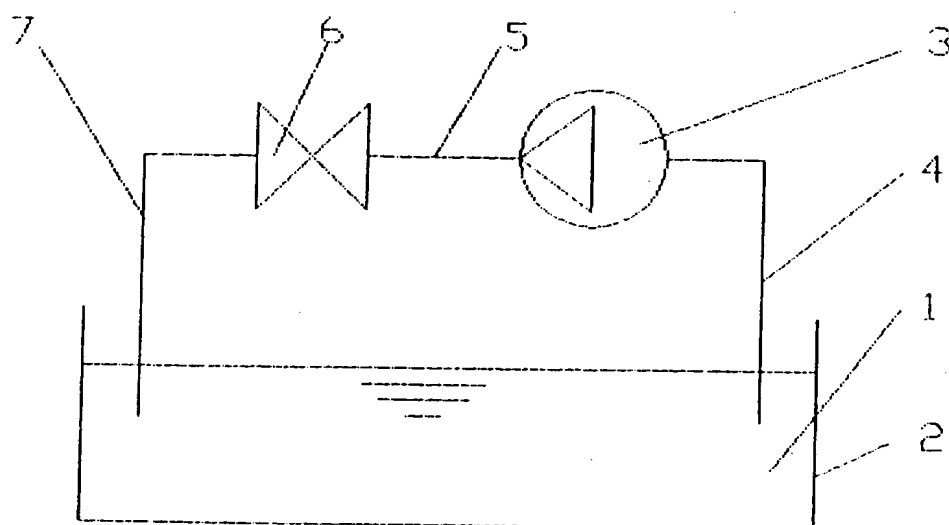


Fig. 1

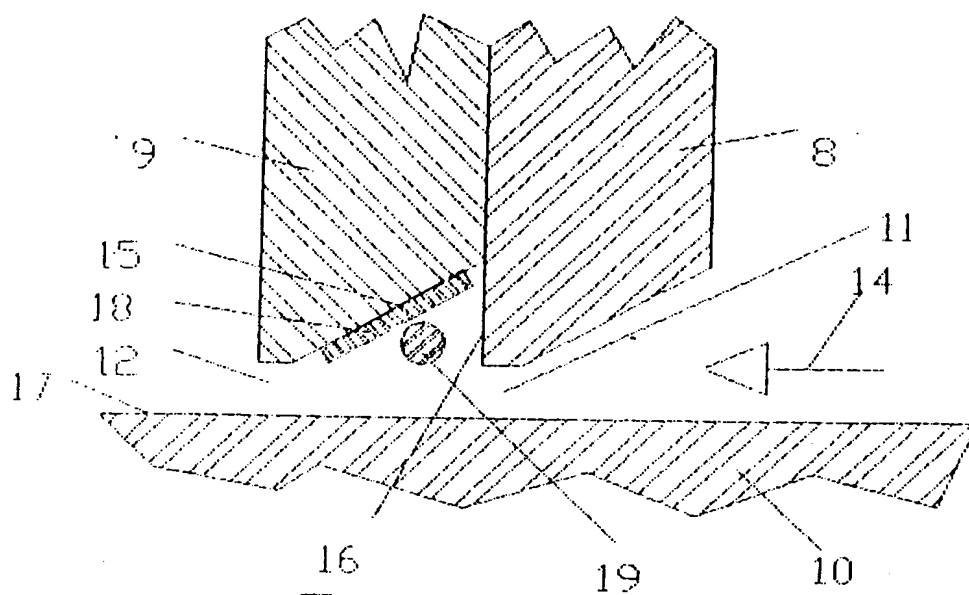


Fig. 2

Fig. 3

Abhängigkeit der Überlebenden Phagen MAL 315 von der Beschallungszeit

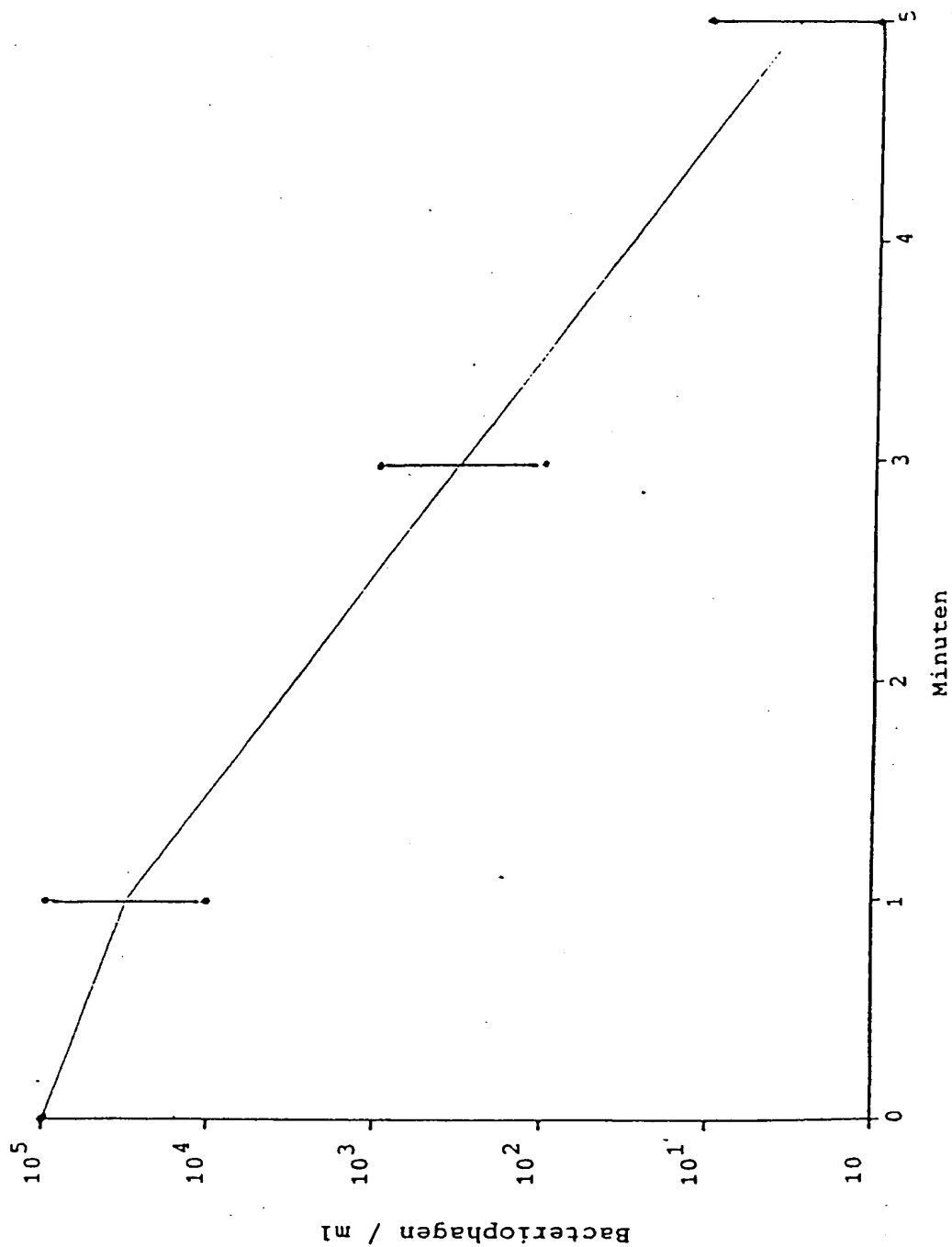




Fig. 4

Abhängigkeit der überlebenden Phagen MAL 103 von der Beschallungszeit

